

Family list

2 family member for: **JP6003317**
Derived from 1 application

**1 MANUFACTURE OF ENZYME ELECTRODE****Inventor:** KISHIMOTO YOSHIHISA**Applicant:** SUMITOMO METAL IND**EC:****IPC:** C12Q1/00; G01N27/327; C12Q1/00 (+3)**Publication info:** JP2636637B2 B2 - 1997-07-30

JP6003317 A - 1994-01-11

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

MANUFACTURE OF ENZYME ELECTRODE

Publication number: JP6003317

Publication date: 1994-01-11

Inventor: KISHIMOTO YOSHIHISA

Applicant: SUMITOMO METAL IND

Classification:

- **International:** C12Q1/00; G01N27/327; C12Q1/00; G01N27/327;
(IPC1-7): C12Q1/00; G01N27/327

- **European:**

Application number: JP19920159412 19920618

Priority number(s): JP19920159412 19920618

[Report a data error here](#)

Abstract of JP6003317

PURPOSE: To manufacture an enzyme electrode having excellent response with excellent reproducibility at a low cost by forming a layer containing enzymes and electronic mediators by a printing method on an organic charge-transfer complex after forming the complex on a conductive substrate. **CONSTITUTION:** The title manufacturing method consists of a process in which an organic charge-transfer complex is formed on a conductive substrate and another process in which a layer containing enzymes and electronic mediators is formed on the complex. The method for forming the layer containing enzymes and electronic mediators consists of a process in which the enzymes are applied, process in which a composition containing reduction mediators is applied, and process in which the reduction mediators are partially or wholly oxidized. A printing method is used for forming the layer containing enzymes and electronic mediators. Therefore, an enzyme electrode having excellent response can be manufactured with high reproducibility at a low cost and the electrode can be easily operated, because no calibration is required for individual electrodes at the time of measurement.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-3317

(43)公開日 平成6年(1994)1月11日

(51)Int.Cl.⁵
G 0 1 N 27/327
// C 1 2 Q 1/00

識別記号 廈内整理番号
B 6807-4B
7235-2J
7235-2J

F I
G 0 1 N 27/30

3 5 3 R
3 5 3 J

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数4(全8頁)

(21)出願番号 特願平4-159412

(22)出願日 平成4年(1992)6月18日

(71)出願人 000002118

住友金属工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72)発明者 岸本 芳久

大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友金属工業株式会社内

(74)代理人 弁理士 広瀬 章一

(54)【発明の名称】 酵素電極の製造方法

(57)【要約】

【構成】 導電性基体上に有機電荷移動錯体を形成し、その上に酵素および電子メディエーターを含む層を形成して酵素電極を製造する際に、酵素および電子メディエーターを含む層の形成に印刷法を用いる。

【効果】 良好的な応答性を有する酵素電極を低成本で再現性良く製造できる。測定時の個々の電極の較正を必要としないので、操作が簡易であり、糖尿病患者の在宅自己血糖値測定等に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (A) 導電性基体上に有機電荷移動錯体を形成する工程、および(B) 該電荷移動錯体上に酵素および電子メディエーターを含む層を形成する工程からなる酵素電極製造方法において、(B) 工程の一部あるいは全部を印刷法により行うことを特徴とする、酵素電極の製造方法。

【請求項2】 (B) 工程が、(1) 前記電荷移動錯体上に酵素を塗布する工程、(2) その上に還元型メディエーターを含む組成物を塗布する工程、および(3) 該還元型メディエーターの一部あるいは全部を酸化型に変化させる工程を含む、請求項1記載の酵素電極の製造方法。

【請求項3】 (B) 工程が、(1) 前記電荷移動錯体上に酵素を塗布する工程、および(2) その上に、少なくとも酸化型メディエーターを含む組成物を塗布する工程を含む、請求項1記載の酵素電極の製造方法。

【請求項4】 (B) 工程が、前記電荷移動錯体上に少なくとも酵素および酸化型メディエーターを含む組成物を塗布する工程を含む、請求項1記載の酵素電極の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、酵素電極の製造方法に関するもので、特に、血液、尿等の体液成分中に含まれる微量の生体基質の濃度測定等に用いるのに適した酵素電極の製造方法に関するものである。

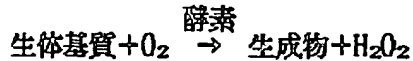
【0002】

【従来の技術】 酵素の優れた基質特異性を利用した分析法が、臨床分析化学、食品製造、環境化学等の分野で注目されている。とりわけ、臨床分析化学の分野では、従来から、グルコース、尿素、尿酸などを選択的に検出しうる酵素電極が知られている。

【0003】 これら酵素電極は、一般には、電極と酵素固定膜とから構成され、酵素反応による物質変化を電極により電気信号の変化量として読み取ることにより、その酵素が特異的に作用する基質の濃度を測定するものである。例えば、グルコースセンサでは、下記式のように酵素反応により生成または消費される過酸化水素、酸素等の電極活性な物質を電極でモニターすることにより、生体基質濃度を測定する。

【0004】

【化1】



【0005】 ところが、このような原理に基づく酵素電極には、次のような問題点がある。

① 上記式で明らかなように、基質が反応するためには、化学量論的な酸素を必要とするが、実際の測定において、例えばグルコースセンサで糖尿病患者の血中グルコ-

である。そのため、試料血液を希釈したり、何らかの方法で酸素を補給するといった手段が講じられている。

【0006】 ② 過酸化水素を電気的にモニターする場合、試料溶液中に過酸化水素と同様の電位で酸化される物質、例えばアスコルビン酸のような還元性物質が存在すると、測定電流にこれら妨害物質の酸化電流がうわのせされ、測定誤差を生じる。そこで、これらの誤差を取り除くため、酵素を固定していない電極を補償極として補正したり、酸素、過酸化水素分子と、測定基質は透過させるが、アスコルビン酸の如く電極活性な緩衝物質を透過させないといった選択透過膜を装着する必要があった。

【0007】 このように、酵素反応に伴い生成あるいは消費される物質の濃度を測定する原理に基づくセンサーは、溶存酸素の影響および妨害物質の影響といった問題を有している。また、酵素固定膜を酸素、過酸化水素電極に装着するという形態を必要とするため、微小化にも限界がある。

【0008】 一方、これらの問題点を解決するため、導電性高分子を利用した酵素電極、電子メディエーターを利用した酵素電極が提案されている。前者は、ポリピロール、ポリアニリン等の導電性高分子の電解重合時に、酵素をモノマー溶液中に共存させ、重合時に重合膜中に酵素を捕捉するか、あるいはあらかじめ重合した導電性高分子膜上に公知方法により酵素固定膜を設けることにより、導電性の酵素固定膜を得るものである。また、電子メディエーターを利用した酵素電極は、カーボンペースト等の中にフェロセン類、ベンゾキノン、フェリシアニ化イオン、N-メチルフェナジニウム等の電子メディエーターを封じ込め、カーボンペースト電極表面に酵素を固定化し、適当な高分子膜で被覆したものである。

【0009】 しかし、導電性高分子を利用して、酵素反応に伴う電子移動を直接検知する酵素電極は、溶存酸素の影響を受けないという利点はあるが、応答性が低く、応答時間が長い等の問題がある。さらに、電解重合時に重合膜中に酵素を捕捉するといった手法を取る場合は、固定化される酵素量を制御することは難しく、また酵素電極として利用する際、酵素の脱離による経時的な基質応答性の低下は避けることができない。また、従来の電子メディエーターを利用した酵素電極では導電度が低く、応答性、応答時間の点で不十分である他、電子メディエーターをカーボンペースト中に分散させた形態をとるため、電子メディエーターの溶出、脱離に伴う経時的な応答性の低下という問題を含んでいる。

【0010】 そこで、本発明者は、これら従来の酵素電極の欠点を解決するものとして、先に、導電性基体表面に、有機電荷移動錯体結晶を含有する導電層を設けた酵素電極を提案した（特願平2-24484号）。この酵素電極は、酵素反応に伴う電子移動を直接検知する方式をと

の影響も少ないと利点に加え、経時安定性に優れ、長期にわたり高精度な応答を与えることができるという利点を有する。また、本発明者はこの酵素電極においてさらに改善を重ね、有機電荷移動錯体と電子メディエーターとを組み合わせることにより、酵素反応に伴う電子移動を効率的に行い、より応答性を向上させることも提案した（特願平3-7908号、特願平3-86884号）。

【0011】ところで、酵素電極を用いるバイオセンサの具体的な用途として、例えば近年増加傾向にある糖尿病患者の在宅自己血糖値測定を考えた場合、バイオセンサの低コスト化と、簡易操作性が必要となる。従来の酵素電極は、いずれもパッチ式あるいはフロー式の形態を取るため装置が大がかりになり、高コストになるため、在宅使用には向きであるのみならず、酵素電極製造時の個々の電極再現性が不十分なため、測定毎に較正を必要とし、その結果操作が煩雑になるという問題があった。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、低成本で、再現性に優れた酵素電極を製造する方法を提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、有機電荷移動錯体を電極材料として利用する酵素電極において、ポリマー厚膜技術を用いて、印刷塗布の技術を利用することにより、酵素の近傍に酸化型電子メディエーターを再現性良く配置できることを見い出し本発明を完成させた。

【0014】本発明の要旨は、(A)導電性基体上に有機電荷移動錯体を形成する工程、(B)該電荷移動錯体上に酵素および電子メディエーターを含む層を形成する工程からなる酵素電極製造方法において、(B)工程の一部であ

*るいは全部を印刷法により行うことを特徴とする、酵素電極の製造方法、である。本発明方法の好適態様には以下の場合がある。

【0015】①(B)工程が、(1)前記電荷移動錯体上に酵素を塗布する工程、(2)その上に還元型メディエーターを含む組成物を塗布する工程、および(3)該還元型メディエーターの一部あるいは全部を酸化型に変化させる工程を含む。

②(B)工程が、(1)前記電荷移動錯体上に酵素を塗布する工程、および(2)その上に、少なくとも酸化型メディエーターを含む組成物を塗布する工程を含む。

③(B)工程が、前記電荷移動錯体上に少なくとも酵素および酸化型メディエーターを含む組成物を塗布する工程を含む。

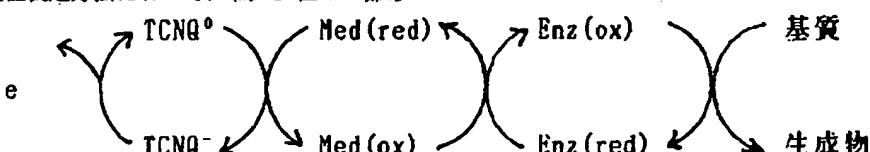
【0016】本発明者らは、有機電荷移動錯体を電極材料として利用する酵素電極の近傍に対極を配置した微小化バイオセンサについても提案している。このバイオセンサは試料の希釈、攪拌が必要なく、微量の試料であっても精度よく測定できる。本発明製造方法をこの微小化バイオセンサに適用すれば、試料の希釈、攪拌の必要がなく、微量の試料でも直接滴下して測定しうるバイオセンサが、再現性よく低成本で製造しうる。

【0017】

【作用】有機電荷移動錯体と電子メディエーターを組み合わせた酵素電極では、検出される応答電流の大部分は、以下の反応スキームに従い、基質濃度を定量できるものと考えられる。ここでは、有機電子受容体としてトラシアノキノジメタン（以下、TCNQと称する）を用いた酸化酵素の場合を示す。

【0018】

【化2】



【0019】

Enz(ox) : 酵素（酸化型）

Enz(red) : " (還元型)

Med(red) : 還元型メディエーター

Med(ox) : 酸化型 "

本発明の酵素電極製造方法は、少なくとも、(A)導電性基体上に有機電荷移動錯体を形成する工程と、(B)酵素およびメディエーターを塗布する工程からなる。導電性基体上に有機電荷移動錯体を形成するには、有機電荷移動錯体を導電性基体表面に直接形成する方が好ましい。例えば、以下に示す方法により、厚さ方向に該錯体結晶を成長させて容易に得ることができ、厚さ方向に良好な導電性をもたせやすくなる。

【0020】導電性基体としては、銅、銀、白金、金等の金属やカーボン電極の他、これらの導電性材料からなる導電層を蒸着等の手段により表面に設けた基体、あるいはこれらの導電性材料の粉末を含有するペーストから作成した基体等が使用できる。ここで、有機電荷移動錯体（以下、有機CT錯体と称する）とは、有機電子受容体と電子供与体とから、両者の間の電荷移動反応に伴い形成される化合物である。

【0021】この有機CT錯体の形成に用いる有機電子受容体としては、特に制限されないが、シアノメチレン官能基を有する化合物が好ましく、中でもジシアノメチレン官能基と、キノンあるいはナフトキノン骨格とを有する化合物が好適である。このうちでも特に 7,7'-メタ-

40 る導電層を蒸着等の手段により表面に設けた基体、あるいはこれらの導電性材料の粉末を含有するペーストから作成した基体等が使用できる。ここで、有機電荷移動錯体（以下、有機CT錯体と称する）とは、有機電子受容体と電子供与体とから、両者の間の電荷移動反応に伴い形成される化合物である。

【0022】この有機CT錯体の形成に用いる有機電子受容体としては、特に制限されないが、シアノメチレン官能基を有する化合物が好ましく、中でもジシアノメチレン官能基と、キノンあるいはナフトキノン骨格とを有する化合物が好適である。このうちでも特に 7,7'-メタ-

テトラシアノキノジメタン (TCNQ) は CT 錫体形成能が強く、得られる有機 CT 錫体の電気伝導度が高いため応答時間、応答性で有利である。また商業的にも比較的入手が容易であることから好適である。

【0022】有機 CT 錫体の形成に用いる電子供与体としては、使用する有機電子受容体と、導電性を有する CT 錫体を形成しうるものであれば、特に制限されるものではなく、有機、無機のいずれでもさしつかえない。具体的には、無機材料としては銅、銀、コバルト、ニッケル、鉄、マンガンなど、また有機材料としては、テトラアフルバレン、テトラセレノフルバレン等のテトラセン類、及びその誘導体、あるいは 2,2'-ビスピリジニアム、N-メチルフェナジニアム等、公知の電子供与体を使用することができる。

【0023】有機 CT 錫体結晶を成長させるには、液相および気相中の公知の方法を使用できる。液相中で有機 CT 錫体結晶を成長させる方法には例えば以下の方法がある。まず、基体表面に電子供与体層を設けたものか、あるいは電子供与体としても機能する銅板等の基体の一部ないしは全部を、有機電子受容体を含有する溶液と接触させる。これにより、溶液中の有機 CT 錫体電子受容体は、基体の表面を構成する電子供与体との間で CT 錫体化反応を起こし、錫体が成長する。

【0024】有機電子受容体含有溶液の調製に使用する溶媒としては、極性のある非プロトン溶剤、例えばアセトニトリル、ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ヘキサメチルホスホルアミド、メチルエチルケトン等が好適である。この溶液における有機電子受容体の濃度は、溶剤 100 重量部に対して通常 0.01 重量部～飽和濃度、好ましくは 0.1 重量部～飽和濃度が適当である。

【0025】有機 CT 錫体の形成は、通常、10～30℃の温度で行うが、用いる有機電子受容体と基体表面の電子供与体の組み合わせによっては、CT 錫体化反応が急激に進み、緻密で均一な目的層が得にくい場合がある。そのような場合は、必要に応じて溶液、基体、雰囲気温度を下げたり、溶液の濃度を低くすればよい。また逆に、錫体化反応が遅く、有機 CT 錫体結晶が必要な厚みに成長するのに長時間を要する場合は、必要に応じて、加熱することができる。有機電子受容体含有溶液の接触時間は、用いる有機電子受容体と電子供与体との組み合わせや目的とする導電層の厚みに大きく依存するが、一般に 10 秒から 1 時間程度である。

【0026】気相成長法としては一般に真空蒸着法を用いることができる。まず、基体表面に電子供与体層を設けたものか、あるいは電子供与体としても機能する銅板等を、減圧下 (1×10^{-3} ~ 1×10^{-7} Torr) に設置し、錫体結晶を成長させたい部分を適当な温度 (100 ~ 300 ℃) に加熱保持する。次に、電子受容体を徐々に加熱

受容体分子と、基体表面の電子供与体との錫体化反応により錫体が成長する。この際、導電層の厚みは基体温度、電子受容体の気化速度等により容易に制御することができます。

【0027】ところで、前述の反応スキームから明らかのように、酵素反応に伴う電子移動過程において、電気化学的に中性の電子受容体 (TCNQ⁰) が必要となってくる。そこで、導電性基体上に有機電荷移動錫体を形成する工程で、中性の電子受容体を存在させることにより、10 より効率的に電子移動を行わせることが可能となる。このためには、液相中で作製する場合は、中性の電子受容体を含む溶液の塗布、乾燥を繰り返すことで、容易に、強制的に中性の電子受容体を存在させることができる。また、気相中で作製する場合には、導電性電荷移動錫体を形成した後、加熱せずにさらに電子受容体を蒸着させることにより、中性の電子受容体を存在させることができる。

【0028】上記のように液相法あるいは気相法により作成した有機 CT 錫体は、一般に微細な針状結晶となり、20 基板面に対して垂直方向に成長する。この有機 CT 錫体からなる導電層の厚みは特に制限されるものではないが、通常 0.01 ~ 50 μm の範囲であり、好ましくは 0.1 ~ 10 μm である。

【0029】このように、導電層はその厚み方向に成長した微細な針状結晶からなるため、導電層の表面は微細な凹凸を有する構造となる。従って、後述の酵素や電子メディエーターの固定化の際には、酵素や電子メディエーターをこの微細な凹部に捕捉することにより、それらの固定化が容易となる。また、微細な針状結晶であるため電極部の実際の表面積を広くとることができ、その結果、酵素および電子メディエーターの固定化量を増大させ、酵素電極の出力として得られる電流密度を大きくすることができる。

【0030】この導電層の厚みが上記範囲以下で薄すぎると、25 充分な表面積を得ることができず、その結果出力電流値が小さくなる。また、逆に上記範囲を超えて厚すぎる場合は、導電層自体の抵抗値が大きくなる。従って、酵素電極として使用する場合、電圧印加の際、電極表面での電圧降下を起こすことになる。また、この有機 CT 錫体自体、力学的な強度は大きくないため、厚すぎるところ構造的な欠陥を生じやすくなる。

【0031】次に、酵素および電子メディエーターを含む層の形成方法について述べる。第一の好適態様は、(1) 酵素を塗布する工程、(2) 還元型メディエーターを含む組成物を塗布する工程、(3) 還元型メディエーターの一部あるいは全部を酸化型に変化させる工程からなる。

【0032】酵素は、公知の共有結合法、イオン結合法、吸着法、包括法、架橋法等を用いて有機電荷移動錫

水溶液等を有機電荷移動錯体上に塗布する方法が簡便で好適である。具体的には、例えば単純にピペット等で酵素溶液を所定量滴下してもよいが、再現性の点からは、スクリーン印刷法、オフセット印刷法、インクジェット法等の公知の印刷技術を用いることにより、一定面積に一定量塗布することが可能であり、より好適である。印刷法による場合は、酵素を、水あるいは有機溶剤中に溶解もしくは分散させ、必要に応じ水溶性あるいは水不溶性高分子を添加することにより、印刷上必要な粘度範囲に調整することができる。

【0033】用いる酵素は、対象とする物質や目的とする化学反応に応じ、酵素の基質特異性及び反応特異性を考慮して適宜選択することができる。使用しうる酵素は、特に制限されないが、例えばグルコースオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ペニシリナーゼ等が挙げられる。また、酸化還元酵素と補酵素との組み合わせも可能である。

【0034】次に、還元型メディエーターを含む層を形成することにより、上記酵素の近傍にメディエーターを配置する。使用する電子メディエーターは、酵素反応に伴う電子移動を効率よく行うことができる、すなわち、酵素から有機CT錯体への電子移動をスムーズに行わせるものであればよい。例えば、酸化酵素により基質を酸化する反応の場合は、還元型となった酵素から容易に電子を取り、電子メディエーター自身は還元型となり、かつ導電層表面での電極反応により電子を電極へ供与し、酸化型に戻る性質を有するものである。このような電子メディエーターとしては、フェロセン、1,1'-ジメチルフェロセン、フェロセンカルボン酸、フェロセンカルボキシアルデヒド等のフェロセン誘導体、ハイドロキノン、クロラニル、プロマニル等のキノン類、フェリシアニオン、オクタシアノタンクス滕酸イオン、オクタシアノモリブデン酸イオン等の金属錯体イオン等が好適である。

【0035】これらの電子メディエーターの塗布は、通常溶液状態で行うが、フェロセン誘導体を例にとると、還元状態では多くの有機溶剤に易溶であるが、酸化状態では有機溶剤に難溶となることが多い。そのため水不溶性高分子を用いて固定化しようとする場合、溶液中ににおいて還元状態では分子分散状態となり、酸化状態では粒子分散状態となる。酵素からの電子移動をスムーズに行わせるには、酵素の酸化還元部位のより近傍にメディエーターを配置することが重要となる。このようない観点からは電子メディエーターを分子分散状態で塗布することが望ましい。

【0036】還元型メディエーターの塗布は、上記還元型電子メディエーターと、水不溶性高分子とを適当な溶剤に溶解させた組成物を作製し、印刷塗布する方法によ

性高分子100重量部に対し、2通常20重量部から300重量部、好ましくは50重量部から200重量部の範囲である。20重量部未満では、メディエーター量が不足して、充分に電子伝達を行わせることができない。また、300重量部超では高分子の量が不足し、塗布工程において均一な膜が得がたいだけでなく、内部に存在する酸素あるいはメディエーターの溶出を引き起こすことになる。

【0037】還元型メディエーターを含む上記組成物を公知の塗布方法により必要部位に印刷する。塗布方法は、特に限定されるものではないが、得られる酵素電極の製造再現性の観点からスクリーン印刷法が好適である。印刷、塗布後、乾燥して有機溶剤を留去することにより還元型メディエーターを含む層が得られる。還元型メディエーターを含む層の厚みは通常、0.01~50μm、好ましくは0.1~5μm程度である。0.01μm未満では、必要なメディエーター量を存在せしめることが難しく、また均一に塗布することも難しい。また逆に50μmを超えると、メディエーター層の厚みが増すことにより、測定中、基質の拡散の妨げになり、その結果、感度の低下あるいは応答の直線性が劣る。

【0038】なお、酵素の塗布あるいは還元型メディエーターの塗布に使用する水不溶性高分子としては、容易に均一に成膜することができ、酵素や電子メディエーターを均一に分散固定し、かつ酵素電極として使用する際、試料溶液中で溶解、膨潤して酵素、電子メディエーターの溶出による出力の低下を招くことのないものであれば限定されることなく使用できる。さらに、導電層中にピンホールが生じていると、酵素電極として使用する際、基体あるいは電子供与体の使用溶液中への溶出の可能性があるが、水不溶性高分子層はピンホール部を覆うことにより溶出を防止する。

【0039】このような水不溶性高分子には、ポリビニルブチラール、ポリエステル、ポリアミド、ポリエスチルアミド等の熱可塑性ポリマーが例示でき、これらの1種または2種以上を使用することができる。酵素、電子メディエーターの固定方法に応じ、また基質の拡散性等を考慮して適宜ポリマーを選択することができるが、例えばポリマー-ビニルブチラールは水不溶性でありながら親水性、吸水性を有し、しかも非常にミクロなポアを有するため好適である。

【0040】前記還元型メディエーターの一部あるいは全部を酸化型に変化させる工程は、前記メディエーター層に中性の電子受容体を接觸させ、メディエーター層内に酸化型メディエーターを析出させる工程である。用いる電子受容体としては、使用している還元型メディエーターとすみやかに酸化還元反応を起こし、自身は電子を受け取り、メディエーターを酸化型に変える性質を有し、かつ還元型メディエーター層内へ拡散、浸透させる能力があれば、特に限定されるものではない。このよう

形成する工程において例示した電子受容体の他、ヨウ素、臭素等のハロゲン類等の無機電子受容体も使用できる。

【0041】通常、これらの電子受容体は適当な溶剤に溶解して、還元型メディエーター層上に塗布、印刷する。このとき用いる溶剤は、電子受容体に対して溶解力を有し、かつ還元型メディエーター層を構成する高分子に対しては溶解性が小さく、高分子層の構造を著しく乱すことがないものであればよい。電子受容体とその溶剤としては、例えば、高分子としてポリビニルブチラールを用い、メディエーターとしてフェロセン誘導体を用いた場合、電子受容体としてTCNQ、その溶剤としてアセトニトリル等のニトリル系溶剤が上記特性を有し好適である。

【0042】電子受容体を含む溶液は、通常0.01重量%～飽和濃度、好ましくは0.05～飽和濃度に調整される。この濃度範囲未満では、還元型メディエーターを十分酸化型に変えることができず、また、この濃度範囲を超えると、必要以上に中性の電子受容体が酵素電極表面に存在することになり、基質拡散の妨げになることがある。電子受容体を含む溶液の塗布方法は、簡易にピペット等で滴下する方法の他、スクリーン印刷、オフセット印刷、インクジェット法等の方法を採用することができる。また、印刷方法によっては、必要な粘度に調整するために高分子化合物を添加することも可能である。電子受容体の塗布は、通常室温で行えるが、還元型メディエーターとの反応が著しく遅い場合必要に応じ加熱したり、逆にその反応が非常に速い場合には同様に冷却したりして、その速度を調整することが可能である。

【0043】第二の好適態様では、有機CT錯体上に酵素を塗布し、次いで、少なくとも酸化型メディエーターを含む層を形成する。この方法は、前述の第2の工程と、第3の工程を1工程にしたものである。すなわち、予め酸化型にしたメディエーターを含む組成物を用いる。一般に製造工程が増えるに従い、製造ロット間、ロット内の特性のバラツキは増大する。従って、製造時の再現性を向上させるには、工程数を減らすことが一つの改良策となる。このような観点から、この方法は有利である。

【0044】この方法において酵素を塗布する方法は、前述の第一の好適態様の方法と同様である。また、この方法における酸化型メディエーターを含む層は、通常、高分子成分を含む。酸化型メディエーターとしては、前述の還元型電子メディエーターを電子受容体との酸化還元反応により予め酸化型としたものである。また、高分子成分としては、前述のポリビニルブチラール等の不水溶性高分子を使用できる他、使い捨てにするような場合には、水溶性高分子を用いることも可能である。

【0045】これら酸化型メディエーターおよび高分子成分は、適当な溶剤に溶解もしくは分散させて、塗布用

分子成分を溶解させることができれば、特に制限されるものではない。組成物中の酸化型メディエーターの含有量は、通常、高分子成分 100重量部に対して、20重量部から 300重量部、好ましくは50重量部から200重量部が望ましい。これは、20重量部未満ではメディエーター量が不足して充分に電子伝達を行うことができず、また逆に300重量部を超えると、高分子成分の量が不足し、塗布工程において均一な膜が得難いのみならず、内部に存在する酵素、メディエーターの溶出を引き起こすことがあるためである。用いる溶剂量は、塗布方法に必要な粘度を確保するため、適宜調整することができる。

【0046】この他、上記組成物中に、前述の反応スキーム中で必要とされる中性電子受容体(TCNQ⁰)を5～50重量%程度含有させ、同時に塗布することにより、酵素反応に伴う電子移動をより効果的に捕らえることも可能である。さらに、分散剤等の添加剤を加えてもよい。上記組成物の調製は、乳バチ、三本ロール、ニーダー、ミキサー等の適当な混練方法により行い、均一に分散した組成物とすることができる。

【0047】塗布方法は、前述の如く公知の方法が適用できるが、製造の再現性、大量生産性の観点から、スクリーン印刷法が好適である。このようにして塗布後、加熱、乾燥等で溶剤を留去し、酸化型メディエーターを含有する層を得る。酸化型メディエーターを含む層の厚みは、通常0.01～50μm、好ましくは0.1～5μm程度である。0.01μm未満では、必要なメディエーター量を存続せしめることが難しく、また均一に塗布することも難しい。また逆に50μmを超えると、基質の拡散の妨げとなる。

【0048】第三の好適態様は、第二の態様における第1の工程と、第2の工程を1工程にしたものである。すなわち、酵素と予め酸化型にしたメディエーターを含む組成物を、有機CT上に塗布する。このように、工程数を減少させることは製造の安定性に好都合である。

【0049】ここで使用する組成物は、前述の第二の方法における、酸化型メディエーターを含有する組成物に酵素を添加することにより容易に得られる。酵素の添加量は、前述の酸化型メディエーターを含有する組成物10重量部に対して、1重量部～50重量部、好ましくは5重量部～30重量部である。1重量部未満では、層中に存在する酵素量が少なく充分な基質応答が得られず、また50重量部を超えると相対的にメディエーター量が不足して応答の直線性が低下する。ここで用いる組成物は、第二の方法において記載したのと同様の配合方法、塗布法を使用して、酵素および酸化型メディエーターを含む層を形成することができる。

【0050】以上説明したような本発明の方法によれば、酵素電極を再現性よく、低コストで製造しうる。この酵素電極は製造時のばらつきが小さいため、測定時に

値測定等に簡便に使用できる。

【0051】本発明方法によって得られる酵素電極は、有機CT錯体に酵素と酸化型メディエーターを直接接触させた構造であり、従来の過酸化水素電極、酸素電極等に比べ構造的に簡単であり、小型化が可能である。また、有機CT錯体結晶からなる導電層は、酵素との間で電子移動が容易であるのみならず、従来電子メディエーターとして使用されていたフェロセン類等と比較して、その結晶層の電気伝導度は著しく大きい。これは、これら有機CT錯体が発達した針状結晶を構成するため、同じ含有量でも膜中の導電バス数が多くなり、電子移動に有效地に寄与するためと考えられる。また、導電層表面に電子メディエーターが固定化されているため、有機CT錯体と酵素が接触しているにもかかわらず構造的に電子移動が起こりにくい部分においても、スムーズな電子移動性を確保し、応答性を向上させることが可能となる。また、有機CT錯体結晶を導電性基材上に直接成長させると、針状結晶の微細な凹凸表面が得られるため、導電層に直接接触する酵素や電子メディエーターの量を多くすることができ、酵素電極の応答性をより一層高めることができる。

【0052】本発明方法により得られた酵素電極を測定極とし近傍に対極を設けて、例えば図1に示すようなセンサとする、あるいはさらに補償極をまとめて1個のセンサとすることができる、微小化することも容易である。このようなセンサでは、測定極と対極、あるいはさらに補償極を試料で覆えば測定できるので、微量の試料でもセンサに直接滴下する等の方法で測定が容易である。ここで補償極とは、目的の酵素反応以外の電気化学的副反応や吸着による影響を防止するために設ける、測定極と同程度の抵抗を有する電極である。

【0053】なお、上記のようなバイオセンサを用いた測定では、参照電極を使用せずに行うことが可能である。このような場合、対極の面積は測定極の面積の2倍以上、好ましくは10倍以上であることが望ましい。これは、測定時に印加する電位差が主に測定極にかかるようになることにより、高精度に定量するためである。

【0054】上記バイオセンサに電位を印加して酵素反応による応答電流を測定する際は、パルス電位を印加するのが好ましい。定常状態電流の印加では、電極の表面状態が目的以外の電気化学反応等により変化するので、測定誤差を生じやすくなる。パルス電位を印加すれば、このような電極の劣化を極力低減でき、安定化時間が短いことからも好適である。また、補償極を設けたバイオセンサを用いた測定では、測定極と対極、および補償極と対極との間に連続して、あるいは同時に所定の電位を印加し、それにより両電極間に流れる電流値を測定し、両者の間の電流値の差を酵素反応による応答電流として定量することができる。

【0055】本発明方法による酵素電極を使用したバイ

等の血液や尿中の微量生体物質や、食品加工プロセスにおける糖分、アルコール分等を測定しうる。

【0056】従来のバイオセンサでは、測定時、希釈、攪拌する必要があったが、上記のような微小化バイオセンサでは、試料を希釈、攪拌することなくそのまま測定でき、しかも上記のような物質を選択的に高精度で、しかも長期にわたって繰り返し分析することができる。

【0057】

【実施例】

【0058】

【実施例1】銅張りガラスエポキシ基板（松下電工製R-1701）をエッチングして図1に示す形状の、測定極部（直径1.5 mm）および対極部を形成し、さらに全面を電解銀めつきして電極とした。次に、電極部以外をエポキシ樹脂塗料をスクリーン印刷してモールドした。対極部は、0.1M塩酸中で 0.4mA/cm^2 の電流密度で2分間アノード分極させ、表面に塗銀を析出させた。

【0059】7,7',8,8'-テトラシアノキノジメタン（試薬、キシダ化学製、以下TCNQと略す）1.0gをアセトニトリル（試薬、スペクトル用）10mg中に加えてTCNQの飽和溶液を調製した。このTCNQ飽和溶液中を $2\mu\text{l}$ 測り取り、室温下で上記電極の測定極部に滴下、自然乾燥した。この操作を計5回繰り返し、測定極部の全面に濃紫色の微細な針状結晶を有する有機CT錯体薄膜を得た。

【0060】グリコースオキシダーゼ（Aspergillus niger 由来、Sigma 社製、TypeVII）40mgを1mlの100mMリン酸緩衝液（pH 7.0）に溶解した後、 $4\mu\text{l}$ を測り取り、上記測定極部に塗布風乾した。

【0061】ポリビニルブチラール樹脂〔商品名：エスレックB、BX-L、穂水化学工業（株）製〕1.0 g、および1,1'-ジメチルフェロセン〔試薬、東京化成（株）製〕1.0 gをエチルカルビトール2.5 gに溶解して還元型メディエーターを含有する組成物とした。この組成物をスクリーン印刷機を用いて前記測定極部に印刷した後、80°C中10分間乾燥して約 $3\mu\text{m}$ の厚みを有する還元型メディエーターを含有する層を形成した。

【0062】次に、前出のTCNQ溶液を $1\mu\text{l}$ 測り取り、上記測定極上に塗布、風乾させた後、純水で洗浄し、酵素電極とした。図2に示す各グルコース濃度のヒト血清 $20\mu\text{l}$ を上記電極系上に滴下し、測定極および対極の全面を試料液で覆った。そのまま室温で1分間放置した後、対極に対して、0.25Vのパルス電位を測定極に印加して、電位印加2秒後の電流値を測定することにより図2に示す各グルコース濃度に対する応答電流を測定した。

【0063】この操作を同様にして作製した合計10個の電極について測定した結果、10個の電極の平均値、およびその最大、最小を含めたばらつきの範囲を図2に示す。

線関係が得られ、かつ10個の電極のばらつきも少ない。

【0064】

【実施例2】実施例1と同様に導電性有機電荷移動錯体薄膜を得た後、同様に酵素溶液を塗布した。TCNQ 5.0 g を300 mlのアセトン中に室温で懸濁させ、TCNQと当量のジメチルフェロセンのアセトン溶液を徐々に滴下し、さらに2時間攪拌した後、濾過、乾燥してジメチルフェロセン-TCNQ錯体を得た。

【0065】ポリビニルブチラール樹脂 1.0 g、上記ジメチルフェロセン-TCNQ錯体を0.7 g、TCNQを 0.3 g 測り取り、2.5 g のエチルカルピトールを加え、乳鉢で良く混練して酸化型メディエーターを含有する組成物を作製した。これを実施例1と同様にして、スクリーン印刷法により、測定極部上に印刷、乾燥して、厚み約4 μm の酸化型メディエーターを含有する層を作製し、酵素電極とした。

【0066】次に、実施例1と同様にして10個の電極について測定した結果を図2に示す。このように、グルコース濃度30 mM程度まで良好な直線性が得られたのみならず、実施例1に比較して、工程数が減少したことにより10個の電極間のばらつきは減少した。

【0067】

【実施例3】実施例2で作製した酸化型メディエーターを含む組成物 4.5 g に 1.0 g のグルコースオキシダーゼを混合し、三本ロールにより混練し、酵素および酸化型メディエーターを含む組成物とした。

【0068】このようにして得られた組成物を、実施例

1と同様にして作製した導電性有機電荷移動錯体薄膜上に、同様にスクリーン印刷法により測定極部に印刷塗布、乾燥することにより、厚み約5 μm の酵素および酸化型メディエーターを含む層を形成し、酵素電極とした。

【0069】次に、実施例1と同様にして10個の電極について測定した結果を図2に示す。このように、グルコース濃度30 mM程度まで良好な直線性が得られたのみならず、実施例1、2に比較して、さらに工程数が減少したことにより10個の電極間のばらつきは著しく減少した。

【0070】

【発明の効果】本発明方法によれば、血清等の生体試料に対しても高基質濃度まで良好な応答を有する酵素電極を、再現性よく製造することができる。得られる酵素電極は製造時のばらつきが小さいので、測定時の個々の電極の較正も必要としない簡単な操作で使用できる。また、低コストでの製造、大量生産が可能である。

【図面の簡単な説明】

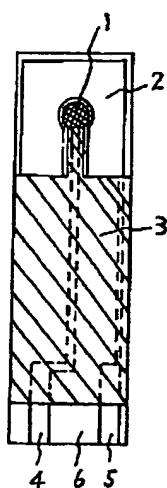
【図1】実施例において製造したバイオセンサの一例を示す図である。

【図2】実施例1～3で測定したグルコース濃度と応答電流の関係を示す図である。

【符号の説明】

1：測定極	2：対極
3：エポキシ樹脂	4：測定極端子
5：対極端子	6：ガラスエポキシ基板

【図1】



【図2】

